

Aus der Forschung Pharma der Schering AG
Berlin/Bergkamen

Untersuchungen zur Bindung von Steroiden an den cytoplasmatischen Androgenrezeptor der Rattenprostata

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Birgitt Köhler, geb. Brauer
Berlin

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

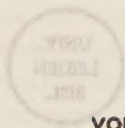
https://archive.org/details/IA41548818_0069

Aus der Forschung Pharma der Schering AG
Berlin/Bergkamen

Untersuchungen zur Bindung von Steroiden an den cytoplasmatischen Androgenrezeptor der Rattenprostata

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Birgitt Köhler, geb. Brauer

Berlin

Referent: Professor Dr. med. Dr. rer.nat. Erich Gerhards

Korreferent: Professor Dr. med. Häring

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 11. Juni 1976



GLIEDERUNG

	Seite
1. EINLEITUNG	5
2. PROBLEMSTELLUNG	14
3. TIERE, GERÄTE, REAGENZIEN	15
3.1 Tiere	15
3.2 Geräte	15
3.3 Reagenzien und Substanzen	15
4. ERGEBNISSE	17
4.1 Aufbau einer Methode zur Untersuchung der Steroidbindung am cytoplasmatischen Androgenrezeptor der Rattenprostata	19
4.1.1 Prinzip der Methode	19
4.1.2 Durchführung der Methode	19
4.1.2.1 Cytosolgewinnung	19
4.1.2.2 Inkubation	20
4.1.2.3 Dichtegradientenzentrifugation	22
4.1.2.4 Radioaktivitätsmessung	22
4.1.2.5 Graphische Darstellung und Auswertung	25
4.1.3 Prüfung der Methode	26
4.1.3.1 Die Bindung von Testosteron im Vergleich zu der von Dihydrotestosteron (DHT) an den cytoplasmatischen Androgenrezeptor	26
4.1.3.2 Prüfung der Bindungsfestigkeit von DHT an den cytoplasmatischen Androgenrezeptor der Rattenprostata	29
4.1.3.3 Versuche zur Abschätzung des ^3H -DHT-Sättigungskonzentrationsbereiches für den cytoplasmatischen Androgenrezeptor	31
4.1.3.4 Untersuchungen zur Bindung von Cyproteronacetat und strukturell verwandten Verbindungen an den cytoplasmatischen DHT-Rezeptor der Rattenprostata	37

5.	DISKUSSION	40
6.	ZUSAMMENFASSUNG	44
	LITERATURVERZEICHNIS	45

1. EINLEITUNG

Unter physiologischen Gesichtspunkten werden Hormone als körpereigene chemische Wirkstoffe definiert, die in speziellen Organen - den endokrinen Drüsen - gebildet, in die Blutbahn sezerniert und im Körper verteilt werden. Auf diesem Weg gelangen sie an den Ort ihrer Wirkung, wo sie chemische oder physikalische Vorgänge der Erfolgszelle steuern und dadurch zu den biochemischen und klinischen Hormonwirkungen führen.

Zwar sind die physiologischen Aufgaben der Hormone - Regulation von Wachstum und Differenzierung sowie Steuerung von Stoffwechselvorgängen - bekannt, und die molekularbiologischen Untersuchungen der letzten Zeit haben auch über den Wirkungsmechanismus von Hormonen mehr Erkenntnis gebracht, es ist aber nicht genau geklärt, wie, wo und in welche Reaktionen Hormone auf molekularer Ebene eingreifen. Darüber bestehen noch immer erst Hypothesen. Diese sind in wesentlichen Teilen aus ursprünglich drei Hauptthesen über den Hormonwirkungsmechanismus weiterentwickelt worden:

1. Hormone wirken durch Aktivierung oder Hemmung bestimmter Enzymsysteme in der Zelle.

Zu dieser Hypothese führten Studien, die anschließend an die Entdeckung der Funktion von Vitaminen als Coenzyme analoge Funktionen von Hormonen suchten. Ein Hormoneinfluß auf Enzyme konnte zum ersten Mal in Untersuchungen über die Wirkung des Schilddrüsenhormons Thyroxin nachgewiesen werden (MARTIUS, HESS, 1951). Am weitgehendsten konnte diese Theorie z.B. für den Wirkungsmechanismus von Adrenalin gesichert werden (HAYNES, SUTHERLAND, RALL, 1960). Andere Ergebnisse, z.B. von Untersuchungen über die Funktion des Östron-Östradiol Paares als Wasserstoffüberträger bei der Transhydrogenasewirkung in Plazentahomogenaten

(TALALAY, WILLIAMS-ASHMAN, 1960) oder über die molekulare Umwandlung der Glutamatdehydrogenase durch Östrogene (TALAL, TOMKINS, MUSHINSKI et al., 1964), führten dazu, mit dieser Hypothese auch die Steroidhormonwirkung erklären zu wollen. Sie war hierfür aber weniger gesichert und umstritten.

2. Hormone wirken über die Veränderung der Permeabilität von Membranen.

Diese zweite Hypothese wurde ursprünglich vor allem für die Erklärung der Wirkung von Proteohormonen entwickelt: 1955 wurde gezeigt, daß die Hauptwirkung von Insulin durch die Beeinflussung der Permeabilität der Zellmembran entsteht (LEVINE, GOLDSTEIN, 1955). Auch für andere Hormone wie ACTH (HECHTER, LESTER, 1960), Thyroxin (LEHNINGER, 1957), Vasopressin (RASMUSSEN, SCHWARTZ et al., 1960) und auch für Nicht-Proteohormone, z.B. Östradiol (AIZAWA, MUELLER, 1961) konnte ein solcher Effekt gezeigt werden.

3. Die dritte Hypothese wurde zuerst von P.KARLSON vorgestellt. Er äußerte die Vermutung, daß Hormone in der Weise wirken, daß sie "ganz allgemein an den Genen angreifen und bestimmte genabhängige Prozesse - insbesondere die Synthese spezifischer Proteine - in Gang setzen" (KARLSON, 1963).

Dazu veranlaßt wurde er durch die Beobachtung, daß an den Riesenchromosomen von Insektenspeicheldrüsen nach Applikation von Ecdyson, dem Häutungs- und Metamorphosehormon der Insekten, die Bildung sogenannter "Puffs" induziert werden kann. Das sind Auftreibungen an bestimmten Genorten, die lichtmikroskopisch als Orte vermehrter m-RNS-Synthese erkennbar sind. Im Cytoplasma wird durch diese m-RNS dann eine spezifische Proteinsynthese veranlaßt.

KARLSON deutete an, daß dieser Mechanismus möglicherweise allgemein, zumindest aber für die Steroidhormonwirkung

gültig ist: Hormone entfalten ihre Wirkung innerhalb der Zelle, indem sie auf der Stufe der Transkription der DNS angreifen, damit die Bildung von m-RNS stimulieren und in der Folge die Bildung spezifischer Proteine in Gang setzen.

Er wies auch auf die Möglichkeit hin, daß alle Hypothesen - die beiden älteren waren mit ziemlicher Ausschließlichkeit verfochten worden - sich nicht unbedingt ausschließen müßten, sondern eventuell alle gültig sein oder sich sogar bedingen könnten. Vor allem aber die letzten beiden Hypothesen bilden noch heute die Grundlagen für die Erklärung des Wirkungsmechanismus von Hormonen.

Betrachtet man neben der Wirkungsweise der Hormone ihre physiologischen Aufgaben, wird ihre allgemeine klinische Bedeutung am ehesten deutlich, wenn man die Folgen bedenkt, die durch ihren Ausfall auftreten. Die Regulation von Wachstum, Differenzierung und Stoffwechselvorgängen kann gestört sein. Zum Beispiel kann es durch das Fehlen von Schilddrüsenhormonen zum Stillstand des Wachstums, sowie der körperlichen und geistigen Entwicklung kommen. Ein Ausfall von Nebennierenrindenhormonen führt zu Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels und des Salz-Wasserhaushaltes. Sexualhormone sind für die Differenzierung im Urogenitaltrakt sowie für die Merkmalsprägung, die auch das psychische Verhalten mit einschließt, notwendig.

Andererseits können Hormone Urheber von Krankheiten oder pathologischem Verhalten sein. Das ist auf verschiedene Arten möglich:

1. Die Hormonmenge ist zu gering bei Insuffizienz und Ausfall der inkretorischen Drüse wie z.B. bei Morbus Addison, Panhypopituitarismus, Sheehan Syndrom, Hypothyreose. Die Therapie besteht im Ersatz der fehlenden Hormone. Die Substitutionsmöglichkeiten sind aber für die beiden großen Hormongruppen, Proteo- und Nicht-

Proteohormone, unterschiedlich, da die Therapie mit Proteohormonen im Hinblick auf Verabreichungsart und Antikörperbildung nach wie vor problematisch ist.

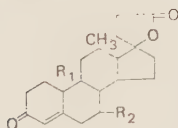
2. Die Hormonmenge ist, absolut gesehen, zu hoch: Ihre Erhöhung ist biochemisch nachweisbar.
 - a) Das kann bei hormonproduzierenden Tumoren der Fall sein, wie z.B. bei Primärem Aldosteronismus, Phäochromozytom, Inselzelladenom sowie bei Schilddrüsentumoren und Tumoren der Nebennierenrinde.
 - b) Ebenso kommt eine Vermehrung bei der Überfunktion der inkretorischen Drüsen ohne Vorhandensein eines Tumors vor; z.B. Hyperthyreose, Cushing-Syndrom.
 - c) Eine Erhöhung resultiert außerdem aus Ursachen, die außerhalb der inkretorischen Drüse liegen und diese zu vermehrter Sekretion veranlassen, z.B. Sekundärer Aldosteronismus, Sekundärer Hyperparathyreoidismus. Die Therapie soll die Überproduktion bzw. die durch sie hervorgerufenen Wirkungen verhindern. Das ist einmal durch chirurgische Ausschaltung des endokrinen aktiven Gewebes möglich, andererseits durch Substanzen, die direkt die Hormonwirkung unterbinden.
3. Die Hormonmenge ist, relativ gesehen, zu hoch: Eine Erhöhung ist biochemisch nicht nachweisbar. Dazu gehören:
 - a) Zustände, bei denen bestimmte Funktionen, auf die die Wirkung eines Hormons gerichtet ist, stärker ausgeprägt sind; die Hormonmenge selbst ist jedoch nicht vermehrt, z.B. pathologische Hypersexualität.
 - b) Krankheitsbilder, die durch Hormone, besonders Steroidhormone, ungünstig beeinflusst werden, z.B. Prostatahypertrophie. Besonders hier bietet sich eine Therapie an, mit der reversibel - im Gegensatz zur chirurgischen Therapie - die Hormonwirkung

ausgeschaltet werden kann, eine Therapie mit sogenannten Antihormonen.

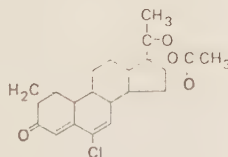
Eine allgemein gültige Definition für den Begriff Antihormon gibt es bisher nicht. Man fordert heute, daß ein Antihormon die Wirkung des Hormons direkt am Ort der Wirkung hemmt, und daß es nicht indirekt wirkt, indem es z.B. in den Regelkreis eingreift, der die Biosynthese und Sekretion des Hormons steuert. Weiterhin soll es keinen Synergismus mit dem Hormon zeigen (s. NEUMANN, 1973).

Die ersten Antihormone, die den angeführten Bedingungen entsprachen, waren Antialdosterone, die zur Gruppe der Steroide gehören. Ihrer Synthese war grundlegend die Entdeckung vorangegangen, daß Progesteron den natriumretinierenden Effekt von Desoxycorticosteron aufheben kann. Es konnte gezeigt werden, daß die Wirkung von Mineralokortikoiden in der Niere durch Spirolacton blockiert wird. Entsprechend dieser Wirkung als Aldosteronantagonisten werden Spirolactone bei Krankheitsbildern mit pathologischer Kochsalz- und damit Wasserretention heute zur Therapie verwendet.

Spirolacton-Gerüst



Cyproteronacetat



Ein zweites Antihormon, das nach den Antialdosteronen eine klinische Bedeutung erlangte, war das Antiandrogen Cyproteronacetat. Es handelt sich ebenfalls um ein Steroid. Die Entdeckung der starken antiandrogenen Eigenschaften des Cyproteronacetat gelang zuerst NEUMANN (s. NEUMANN, 1968, 1973). Prinzipiell werden durch Cyproteronacetat alle in ihrer Funktion und

Morphologie androgenabhängigen Organe und Organsysteme beeinflusst (NEUMANN, 1970). Daraus ergeben sich verschiedene klinische Anwendungsmöglichkeiten wie z.B. bei Prostatahypertrophie und Prostatakarzinom (SCOTT, SCHIRMER, 1966; SMITH, GOODWIN, 1967; s. NEUMANN, 1970), Hypersexualität und Sexualderivationen (LASCHET und LASCHET, 1967), Hirsutismus (HAMMERSTEIN und CUPCEANCU, 1969). Alle anderen bisher als Antiandrogene beschriebenen Verbindungen - überwiegend Steroide - haben weder in der Klinik noch experimentell Bedeutung erlangt. Sie waren entweder zu schwach oder nur in bestimmten Dosen antiandrogen wirksam. Sie wirkten teilweise selbst androgen oder waren zu toxisch.

Bei der Suche nach weiteren Antagonisten gegen andere Steroidhormone wurden zahlreiche Verbindungen synthetisiert, die bisher aber keine wesentliche klinische Bedeutung erlangt haben.

Die Suche nach Antihormonen hatte und hat mehrere Gründe:

1. Antihormone sind für die Therapie von Interesse, da sie die betreffenden Hormone, durch die Krankheiten hervorgerufen oder beeinflusst werden, ausschalten können.
2. Mit Antihormonen können physiologische Wirkungen der Hormone aufgedeckt werden. Durch Verdrängung der betreffenden Hormone unterbrechen die Antihormone die hormongesteuerten Vorgänge. Deren Ausfall macht die physiologischen Hormonwirkungen deutlich.
3. Antihormone können außerdem dazu dienen, den biochemischen Wirkungsmechanismus von Hormonen aufzuklären.

Vor allem Untersuchungen mit den chemisch definierten und in ihrer Struktur bei verschiedenen Species nicht unterschiedlichen Steroidhormonen, sowie ihren Antagonisten brachten neue Gesichtspunkte:

1. Die Primärreaktion eines Steroidhormons ist die spezifische Bindung an einen Rezeptor in der Zelle des Erfolgsorgans; dieses wird vom Hormon als solches erst durch das Vorhandensein eines spezifischen Rezeptors erkannt. Alle weiteren Reaktionen sind Folgereaktionen.
2. Die Wirkung eines Antihormons wird durch Konkurrenz mit dem Hormon am Rezeptor ausgelöst.

Diese Rezeptorhypothese wurde zuerst von JENSEN (s. 1973) aufgestellt. Er zeigte, daß markiertes Östradiol, wenn man es Ratten injiziert, in seinen Erfolgsorganen akkumuliert und daß eine Retention auftritt, während andere Organe eine der Blutkonzentration entsprechende Konzentration zeigen. Das wies ihn auf eine spezifische Bindung des Hormons im Erfolgsorgan hin, für die er Rezeptoren, wahrscheinlich Proteine, postulierte. Im folgenden konnte in Untersuchungen über die intrazelluläre Verteilung von Östradiol gezeigt werden, daß es zwei Rezeptoren mit unterschiedlichen Sedimentationskonstanten gibt: einen cytoplasmatischen und einen Kernrezeptor. Die Bindung an den cytoplasmatischen Rezeptor ist für die Bindung an den Kernrezeptor eine *conditio sine qua non*. Erst durch die Bindung des Hormons an den cytoplasmatischen Rezeptor wird ein Eintritt des Hormons in den Kern in Form des Hormon-Rezeptorkomplexes möglich. Hier wird der Komplex an das Kernchromatin gebunden, als Folge davon wird die m-RNS-Synthese und im weiteren die Proteinsynthese stimuliert, so daß Enzyme oder andere Proteine entstehen (JENSEN, 1973).

Parallel zu den spezifischen Östrogenrezeptoren im Uterus wurde auch nach spezifischen Rezeptoren für Androgene gesucht. Bis vor einiger Zeit galt das in den Testes gebildete Testosteron als das biologisch am stärksten wirksame Androgen. Inzwischen wurde aber gezeigt, daß Testosteron

in bestimmten Zielorganen erst nach Reduktion zu 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) wirkt. Injiziert man Ratten, die 24 h vor der Applikation kastriert wurden, radioaktiv markiertes Testosteron, so findet man, daß eine Stunde nach der Injektion 50-70 % der Radioaktivität in Prostata und Samenblase auf DHT entfallen, in Muskel und Leber weniger als 0,3 % (BRUCHOVSKY und WILSON, 1968). Bei der Vermittlung der androgenen Information an die Zielzelle spielt DHT die zentrale Rolle. DHT ist das aktive intrazelluläre Androgen; schon einige Minuten nach Injektion kann es im Zellkern nachgewiesen werden, ebenso noch 6 bis 16 Stunden später, während es aus dem Blut und anderen Geweben schnell eliminiert wird (ANDERSON, LIAO und FANG, 1969). Testosteron stellt gleichsam die Transportform androgener Aktivität im Blut dar. Von mehreren Arbeitsgruppen wurden Rezeptoren für Androgene in den Zellen von Prostata und von Samenblasen nachgewiesen (LIAO und FANG, 1969, MAINWARING, 1969, TVETER und HANSSON, 1971, BAULIEU und JUNG, 1971). Der 105.000 g Überstand des Gewebehomogenates enthält nach DHT-Injektion oder nach in vitro-Inkubation mit DHT einen DHT-Proteinkomplex mit einer Sedimentationskonstanten von 3 - 3,5 S (ANDERSON, LIAO und FANG, 1969). Andere Autoren fanden einen mit 7 - 9 S sedimentierenden Komplex (BAULIEU und JUNG, 1970, MAINWARING, 1969). Offensichtlich kann das Rezeptorprotein in verschiedenen Polymerisationsformen oder in Verbindung mit anderen Zellkomponenten vorkommen (LIAO und TYMOCZKO, 1971).

In Zellkernen von Prostatagewebe kann ein DHT-Proteinkomplex mit einer Sedimentationskonstanten von 3 S nachgewiesen werden. Inkubiert man allein Zellkerne von Prostatagewebe mit DHT, so wird kein Steroidproteinkomplex gebildet, wenn nicht auch Cytosol hinzugefügt wird. Der Cytosolrezeptor ist möglicherweise ein Aufnahme-rezeptor (FANG, ANDERSON und LIAO, 1969, HANSSON, 1971). Durch eine Bindung von DHT an den Cytosolrezeptor wird

erst die strukturelle Voraussetzung geschaffen, die ein weiteres Eindringen in den Kern ermöglicht. Diese kann eventuell in einer Veränderung der Steroidstruktur oder des Rezeptorproteins oder des Steroidrezeptorkomplexes liegen; wahrscheinlich wird das Hormon nicht einfach an den Kernrezeptor weitergegeben, sondern dieser stammt selbst vom Cytosolrezeptor ab. Ob die Rezeptoren nur zur Akkumulation des Hormons sowie für seinen Transport in den Zellkern dienen, oder ob das Rezeptorprotein selbst bei der von KARLSON beschriebenen Genregulation auf der Stufe der Transkription beteiligt ist, wurde aber noch nicht geklärt.

Hormonwirkung einer Substanz ist demnach möglich, wenn diese über die Bindung an den Cytosolrezeptor in den Kern gelangen und dort die beschriebenen Folgereaktionen auslösen kann. Als Antihormon würde eine Substanz wirken, wenn sie das wirksame Hormon am Rezeptor kompetitiv verdrängt. Das bekannte Antiandrogen Cyproteronacetat verringert z.B. die Bildung des DHT-Kernrezeptorkomplexes (FANG und LIAO, 1969). Die DNS-Konzentration im Prostatagewebe war bei den mit Cyproteronacetat behandelten männlichen Ratten relativ höher, die RNS-Konzentration relativ niedriger als bei Kontrolltieren. Im Gegensatz dazu führte eine Behandlung der Tiere mit Testosteron zu relativer DNS-Abnahme und RNS-Zunahme. Dieser Testosteron-Effekt wird durch gleichzeitige Behandlung mit Cyproteronacetat vermindert (SCHEUER, DAHNKE, JÄGER und MOSEBACH, 1969).

Eine weitere Aufklärung des Hormonwirkungsmechanismus würde die Aufgabe erleichtern, Substanzen für die klinische Hormon- oder Antihormontherapie zu entwickeln. Studien über Strukturwirkungsbeziehungen haben zwar Hinweise auf die beim Steroidgerüst notwendigen Konfigurationen und Substituenten gegeben (NEUMANN, 1973, LIAO, TYMOCZKO, LIANG, ANDERSON und FANG, 1970), die genauen strukturellen Voraussetzungen sind aber noch nicht bekannt.

2. PROBLEMSTELLUNG

Der primäre Nachweis der Hormon- oder Antihormoneigenschaften sowie der Strukturwirkungsbeziehungen erfolgt im allgemeinen im Tierversuch. Durch die Entwicklungen der letzten Jahre ist es heute auch möglich, für diese Untersuchungen Hormonrezeptoren einzusetzen (BAULIEU; LIAO; NEUMANN).

In Tierversuchen kann bestimmt werden, ob eine Substanz im Sinne eines Hormons oder Antihormons wirkt. Die Wirkung kann dabei durch die verabreichte Substanz oder einen ihrer Metaboliten hervorgerufen sein. Im Gegensatz dazu ist bei der Bestimmung der Rezeptor-Hormon-Bindung eine Aussage über die hormonelle "Intrinsic Activity" möglich, wenn die Rezeptorbindung eine notwendige Voraussetzung für die hormonelle Wirkung ist. Im Gegensatz zu in vivo Versuchen kann man sich hier auf die tatsächlich eingesetzte Substanz beziehen, da Metabolisierungsvorgänge bei diesen Ansätzen ausgeschlossen werden können.

In der vorliegenden Arbeit sollte aufbauend auf einige Literaturangaben (LIAO) eine Methode weiterentwickelt und erprobt werden, die für die Untersuchung von Steroidbindungen an den cytoplasmatischen Androgenrezeptor der Rattenprostata sowie u.U. für Voraussagen von Hormon- oder Antihormoneigenschaften synthetischer Steroide geeignet ist.

In einem zweiten Teil der Arbeit sollte die Bindung einiger synthetischer - biologisch eventuell interessanter - Steroide an den cytoplasmatischen Androgenrezeptor der Rattenprostata untersucht werden.

3. TIERE, GERÄTE, REAGENZIEN, SUBSTANZEN

3.1 Tiere

Als Versuchstiere dienten 300 - 350 g schwere männliche Ratten der Tierzuchterei Brünger, Bokel 111.

3.2 Geräte

- 1) Potter-S-Homogenisator der Fa. B.Braun, Melsungen
- 2) Autoanalyzerpumpe der Fa. Technicon
- 3) Schwenkbecherrotor Titan 60; Omega II Ultrazentrifuge der Fa. Hereaus Christ.
- 4) Flüssigkeitsszintillationszähler der Fa. Packard, Modell TRI-CARB Nr. 3375
- 5) Eppendorf-Photometer

3.3 Reagenzien und Substanzen

1) Radioaktive Substanzen

- a) 5α -Dihydrotestosteron 1α , 2α - ^3H : The Radiochemical Centre, Amersham, 47 Ci/mMol
- b) Testosteron 1α , 2α - ^3H : The Radiochemical Centre, Amersham, 56 Ci/mMol
- c) Tritiated Toluene: Packard Instrument Company, $2,55 \cdot 10^6 \pm 1,0$ dpm/g

2) Steroide

Alle untersuchten Substanzen wurden im Department für Steroidchemie der Schering AG, Berlin, Bergkamen, synthetisiert.

- a) Cyproteron: $1,2\alpha$ -Methylen-6-chlor- 17α -hydroxy-4,6-pregnadien-3,20-dion
- b) 20α -OH Cyproteron: $1,2\alpha$ -Methylen-6-chlor- 17α , 20α -dihydroxy-4,6-pregnadien-3-on
- c) 20β -OH Cyproteron: $1,2\alpha$ -Methylen-6-chlor- 17α , 20β -dihydroxy-4,6-pregnadien-3-on

- d) 17-Ketocyproteron: 1,2 α -Methylen-6-chlor-4,6-androstadien-3,17-dion
 - e) Cyproteronacetat: 1,2 α -Methylen-6-chlor-17-acetoxy-4,6-pregnadien-3,20-dion
 - f) 11 β -OH Cyproteronacetat: 1,2 α -Methylen-6-chlor-11 β -hydroxy-17-acetoxy-4,6-pregnadien-3,20-dion
 - g) 17 α -Acetoxy-5 α -pregn-1-en-3,20-dion
 - h) Cyproteronbutyrat: 1,2 α -Methylen-6-chlor-17-butyryloxy-4,6-pregnadien-3,20-dion
 - i) Cyproteroncapronat: 1,2 α -Methylen-6-chlor-17-hexynoyloxy-4,6-pregnadien-3,20-dion
 - j) 1,2 α -Methylen-6-chlor-17 $\alpha\alpha$ -hydroxy-17 $\alpha\beta$ -methyl-D-homo-4,6-androstadien-3,17-dion
 - k) 1,2'-Methylen-6-chlor-17 α -hydroxy-17 β -methyl-D-homo-4,6-androstadien-3,17 α -dion
- 3) Szintillatorflüssigkeit: 100 g Naphthalin (rein, sublimiert), 10 g 2,5-Diphenyloxazol (Szintillationsgrade) = PPO, 0,25 g 2,2-p-Phenylen-bis-(5-phenyl-oxazol) = POPOP, mit Dioxan (reinst) ad 1.000 ml.

4. ERGEBNISSE

Wie beschrieben wurde, ist Cyproteronacetat ein biologisch stark wirksames Antiandrogen. Neben der mehr zufällig entdeckten antiandrogenen Eigenschaft zeigt diese Verbindung eine ausgeprägt starke gestagene Wirkung und es ist interessant zu bemerken, daß die antiandrogene Eigenschaft der Verbindung bei der Suche nach starken Gestagenen entdeckt wurde.

Nach der tierexperimentell endokrinologischen Charakterisierung des Cyproteronacetats als stark wirksames Gestagen mit einer zusätzlich ausgeprägten starken antiandrogenen Wirkungskomponente (NEUMANN, 1973) sollte die auf Grund der Tierversuche aufgestellte Hypothese mit biochemischen Methoden unterbaut werden, nach der Cyproteronacetat Testosteron bzw. Dihydrotestosteron im Sinne eines kompetitiven Inhibitors vom Androgenrezeptor in den Zielorganen verdrängen sollte.

Weiterhin war durch die tierexperimentellen Untersuchungen von NEUMANN und Mitarbeitern bereits gezeigt worden, daß das nicht veresterte Cyproteron ein "reines" Antiandrogen ist, das heißt, eine Verbindung, die kompetitiv die Androgenrezeptorbindung hemmt, ohne aber im Gegensatz zum Cyproteronacetat die hypophysäre Gonadotropinsekretion zu hemmen. Auf Grund der biologischen Daten wurde das nicht veresterte Cyproteron als relativ schwaches Antiandrogen charakterisiert und die im Vergleich zum Cyproteronacetat deutlich geringere antiandrogene Wirkung des Cyproteron wurde damit erklärt, daß Cyproteron nicht die den Gestagenen eigene hypophysenhemmende Eigenschaft besitzt. Hinzu kommt, daß unter der Behandlung mit nicht verestertem Cyproteron die Gonadotropinsekretion sogar ansteigt und daß es über die vermehrte LH-Sekretion zu einer verstärkten Testosteronbiosynthese und Sekretion kommt. NEUMANN und Mitarbeiter

erklärten diesen biologisch nachgewiesenen Effekt des freien Cyproteron damit, daß Cyproteron auch in den die Gonadotropinsekretion regulierenden übergeordneten Zentren des Hypothalamus Testosteron kompetitiv verdrängt, ohne selbst eine "Intrinsic Activity" im Sinne eines negativen Feedback zu entfalten. Das heißt, der Hypothalamus registriert nach Verabreichung des nicht veresterten Cyproteron ein Testosterondefizit im Plasma und reagiert mit verstärkter Gonadotropinsekretion, die ihrerseits, wie vorstehend bemerkt, zu einer vermehrten testikulären Testosteronsekretion führt. Zu Beginn der Behandlung mit hohen Dosen Cyproteron ist auf Grund des kompetitiven Hemmungsmechanismus an den Testosteronrezeptoren eine antiandrogene Wirkung des Cyproteron nachweisbar. Bei längerer Behandlungsdauer wird aber auf dem vorstehend beschriebenen Wege so viel Testosteron sezerniert, daß der antiandrogene Effekt des Cyproteron kompensiert wird, das heißt, die für eine kompetitive Verdrängung des Testosteron von seinen Rezeptoren in den Erfolgsorganen erforderliche Cyproteronkonzentration wird auf Grund der hohen Testosteronspiegel im Organismus nicht mehr erreicht.

In der vorliegenden Arbeit sollte die methodische Voraussetzung geschaffen werden, um die vorwiegend aus den Untersuchungen von NEUMANN und Mitarbeitern erhaltenen tierexperimentellen Ergebnisse mit biochemischen Methoden zu unterbauen.

4.1 Aufbau einer Methode zur Untersuchung der Steroidbindung am cytoplasmatischen Androgenrezeptor der Rattenprostata

4.1.1 Prinzip der Methode

Aus ventraler Rattenprostata wird 24 h nach Kastration der Tiere "Cytosol", der 105.000 g Überstand des Homogenats, gewonnen. Cytosol wird mit ^3H -Dihydrotestosteron - ^3H -DHT - in einer Konzentration, bei der der Rezeptor abgesättigt ist, inkubiert. Durch eine Glycerindichtegradientenzentrifugation wird anschließend der ^3H -DHT-Rezeptorkomplex vom nicht-Rezeptor-gebundenen ^3H -DHT abgetrennt. Nach der Zentrifugation wird die Aktivitätsverteilung im Gradienten gemessen, die als Maß für die Bindung und Menge des Rezeptorprotein dient. Um die relative Affinität von synthetischen Steroiden - bezogen auf ^3H -DHT - zu bestimmen, wird ^3H -DHT gleichzeitig mit dem zu untersuchenden nicht radioaktiven "kalten" Steroid inkubiert. Abhängig von der Affinität des jeweiligen "kalten" Steroids zum cytoplasmatischen Rezeptor wird ^3H -DHT aus der Rezeptorbindung verdrängt. Den Grad dieser Verdrängung gibt die Abnahme der Radioaktivität des ^3H -DHT-Rezeptorkomplexes (angegeben in Prozent) an.

4.1.2 Durchführung der Methode

4.1.2.1 Cytosolgewinnung

Brünger Ratten mit einem Gewicht von 300 - 350 g wurden in Äthernarkose kastriert, um endogene Androgene weitgehend zu entfernen. 24 Stunden nach der Kastration wurden die Tiere in Äthernarkose decapitiert und ausgeblutet. Die ventralen Prostatae wurden schnell herauspräpariert und in eisgekühlter wässriger 0,25 m Saccharoselösung aufbewahrt, danach von anhaftendem

Fremdgewebe getrennt und wieder in eiskühlter Saccharoselösung aufbewahrt. Alle weiteren Arbeiten wurden im Kühllabor bei 2°C durchgeführt. Die Prostatae wurden nach Entfernung der anhaftenden Saccharoselösung mit Filterpapier 1 1/2 min mit der Schere zerkleinert, danach mit Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, im Verhältnis 1:1 (Gewicht zu Volumen) versetzt und unter Eiskühlung mit dem Potter-S-Homogenisator mit 5 x je 2 Strokes bei 400 UPM homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 105 000 g zentrifugiert, das Cytosol zwischen Fettschicht und Sediment in Portionen von 1,0 ml gesammelt und bei -18°C aufbewahrt. Da einheitliches Cytosol für die gesamte Versuchsreihe verwendet werden sollte und, wie in Vorversuchen geprüft wurde, Cytosol seine Bindungsfähigkeit über mehrere Wochen behält, wurden die Prostatae von insgesamt 180 Ratten gemeinsam aufgearbeitet.

4.1.2.2 Inkubation

Unmittelbar vor dem Inkubationsansatz wurden folgende Lösungen hergestellt:

- 1) ^3H -DHT-Lösung, $2 \cdot 10^{-8}$ molar in Tris-HCl Puffer:
0,03 ml einer $1 \cdot 10^{-7}$ molaren aethanolischen ^3H -DHT-Lösung werden eingedampft und mit 0,15 ml Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, wieder gelöst.
- 2) Lösungen der nicht radioaktiv markierten Steroide, $1 \cdot 10^{-6}$ molar in Tris-HCl-Puffer:
Aethanolische Lösungen von 100 mg Steroid pro 0,1 ml werden mit Tris-HCl-Puffer auf die angegebene Konzentration verdünnt.

Inkubationsansätze

1) Kontrollansatz zur Bestimmung der ^3H -DHT-Bindung

0,3 ml Cytosol

0,03 ml ^3H -DHT-Lösung

0,33 ml Gesamtvolumen (^3H -DHT, $1,82 \cdot 10^{-9}$ molar)

2) Ansatz zur Bestimmung der Konkurrenz durch das
"kalte" Steroid

0,3 ml Cytosol

0,03 ml ^3H -DHT-Lösung

0,03 ml "kalte" Steroid-Lösung

0,36 ml Gesamtvolumen (^3H -DHT, $1,7 \cdot 10^{-9}$ molar;
"kaltes" Steroid $0,83 \cdot 10^{-7}$ molar)

Bei der Bestimmung der Konkurrenz durch die "kalten" Steroide wurden diese also in einer etwa um den Faktor 50 höheren Konzentration als ^3H -DHT verwandt.

Die Lösungen von ^3H -DHT und nicht radioaktiv markierten Steroiden wurden jeweils fünf Minuten vor der Inkubation gemischt, um beide Steroide am Rezeptor von Anfang an konkurrieren zu lassen, was beim nacheinander folgenden Hinzufügen zum Cytosol nicht berücksichtigt würde. Nach Zugabe des Cytosols wurde zwei Stunden bei 20°C unter Schütteln inkubiert.

Für die Bestimmung der Konkurrenz wurden immer drei als Doppelwerte durchgeführte Inkubationsansätze ausgeführt.

4.1.2.3 Dichtegradientenzentrifugation

Mit je 0,1 ml der Inkubationsmischungen wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dazu wurden 4 bis 6 Stunden vor dem Ansatz Glyzerin-dichtegradienten mit 10 % > 30 % Glyzerin in 0,01 molarem Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, hergestellt (Volumen 5,0 ml).

Auf die Dichtegradienten wurde jeweils 0,1 ml Inkubationslösung aufgetragen - dabei wurden jeweils Doppelwerte ausgeführt -, anschließend wurde im Schwenkbecherrotor Titan 60 mit einer Omega II Ultrazentrifuge bei 45.000 UPM 16 Stunden zentrifugiert.

Die Gradienten wurden mit Hilfe einer Autoanalyzerpumpe fraktioniert. Eine Fraktion entsprach einem Volumen von 0,2 ml; durchschnittlich wurden insgesamt 24 Fraktionen gesammelt.

4.1.2.4 Radioaktivitätsmessung

Zu jeder Fraktion wurden 12 ml Szintillationsflüssigkeit pipettiert und die ^3H -Aktivität der einzelnen Proben im Packard TRI-CARB gemessen.

Um das Quenchverhalten des Gradienten zu bestimmen, wurde ein interner Standard mit markiertem Taluol angesetzt. Anhand der errechneten Quenchwerte (Tab.1) wurde eine Korrekturkurve gezeichnet:

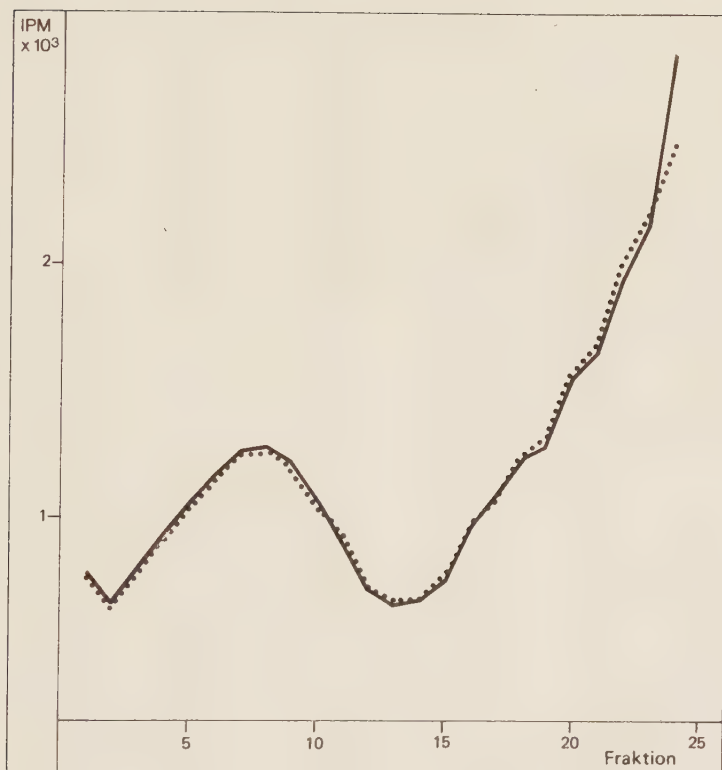


Abb. 1: — ³H-DHT; ³H-DHT korrigierte Kurve

Fraktion	I	II	III	IV	V
	I(F)	I(S)	I(F,S)	Q	I _K (F)
	IPM			II:(III-I)	IPM
1	790	7165	8110	0,98	774
2	629	7039	7692	0,99	627
3	793	8560	9391	0,99	790
4	928	7512	8462	0,99	926
5	1049	7639	8753	0,98	1037
6	1160	7918	9336	0,98	1136
7	1259	7632	9064	0,99	1251
8	1272	7804	9255	0,97	1236
9	1216	7989	9322	0,98	1195
10	1067	7817	9106	0,98	1045
11	910	7529	8502	1,01	919
12	711	7954	8447	1,01	718
13	658	7649	8395	1,02	671
14	683	8018	8787	1,00	686
15	765	6930	7832	1,01	772
16	976	7492	8431	1,00	976
17	1080	8186	9196	0,99	1078
18	1217	7926	9396	1,01	1229
19	1293	8258	9765	1,02	1318
20	1556	7135	8905	1,02	1587
21	1641	8170	10056	1,03	1673
22	1969	7865	10099	1,03	2028
23	2161	7819	10170	1,02	2204
24	2856	7669	9328	0,87	2484

Tabelle 1

Anmerkung: I(F): Anzahl der Impulse der Fraktion
I(S): Anzahl der Impulse des Standards
I(F,S): Anzahl der Impulse des Gemisches
Fraktion-Standard

Q: Quench; errechnet sich als $Q = \frac{I(S)}{I(F,S) - I(F)}$

I_K(F): korrigierter Wert für die Impulszahl
der Fraktion $I_K(F) = I(F) \times Q$

Wie gezeigt, weicht die korrigierte Kurve von der ursprünglichen praktisch nicht ab. Bei weiteren Gradienten wurde deshalb das Quenchverhalten nicht bestimmt.

4.1.2.5 Graphische Darstellung und Auswertung

Die graphische Darstellung und Auswertung soll an einem Beispiel gezeigt werden:

Bei der Inkubation von Cytosol mit ^3H -DHT sowie ^3H -DHT zusammen mit nicht markiertem DHT, im Verhältnis 1:1 ($1,7 \cdot 10^{-9}$ molar), ergab sich von der Aktivitätsverteilung nach der Dichtegradientenzentrifugation das in Abb. 2 dargestellte Bild.

Zur Errechnung der Kompetition des ^3H -DHT und des DHT am cytoplasmatischen Rezeptor addiert man die Impulse unter dem jeweiligen Peak. Die Summe der Impulse des ^3H -DHT-Peak wird jeweils 100 % gesetzt. Die Kompetition durch DHT errechnet sich in dem in Abb. 2 gezeigten Beispiel dann wie erwartet zu ca. 50 %.

Impulszahl des ^3H -DHT-Peak:

14 235 IPM = 100 %

Impulszahl des

(^3H -DHT + DHT) Peak:

7 238 IPM = 49,2 %

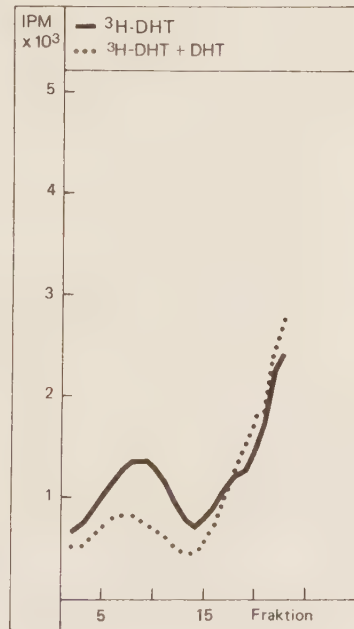


Abb. 2

Um die Kompetition der untersuchten Steroide zu errechnen, wurden von den als Doppelwerte durchgeführten Inkubationsansätzen Mittelwerte errechnet, die für die graphischen Darstellungen verwandt wurden.

4.1.3 Prüfung der Methode

4.1.3.1 Die Bindung von Testosteron im Vergleich zu der von Dihydrotestosteron an den cytoplasmatischen Androgenrezeptor der Rattenprostata

Zur Untersuchung, ob die Bindung von Testosteron an den cytoplasmatischen Androgenrezeptor sich von der des DHT unterscheidet, wurde Cytosol in verschiedenen Anordnungen mit Testosteron und DHT inkubiert:

Cytosol mit ^3H -Testosteron ($1,7 \times 10^{-9}$ molar)
(Abb. 3)

Cytosol mit ^3H -Testosteron und Testosteron, im Verhältnis 1:1 ($1,7 \times 10^{-9}$ molar) (Abb. 4)

Cytosol mit ^3H -Testosteron und DHT, im Verhältnis 1:1 ($1,7 \times 10^{-9}$ molar) (Abb. 5)

Cytosol mit ^3H -DHT und Testosteron, im Verhältnis 1:1 ($1,7 \times 10^{-9}$ molar) (Abb. 6)

Die Abb. 3 zeigt, daß nach der Inkubation von Cytosol mit ^3H -Testosteron kein der Aktivitätsverteilung bei ^3H -DHT Inkubation entsprechendes Bild mit einem typischen Rezeptorpeak entsteht.

Nach der Inkubation von ^3H -Testosteron mit Testosteron bzw. DHT - Abbildungen 4 und 5 - entsteht ein Aktivitätsverlust im Bereich der Rezeptorfraktionen (Fraktion 4-15).

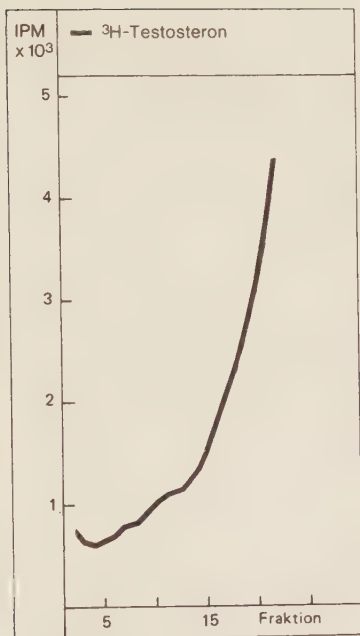


Abb. 3

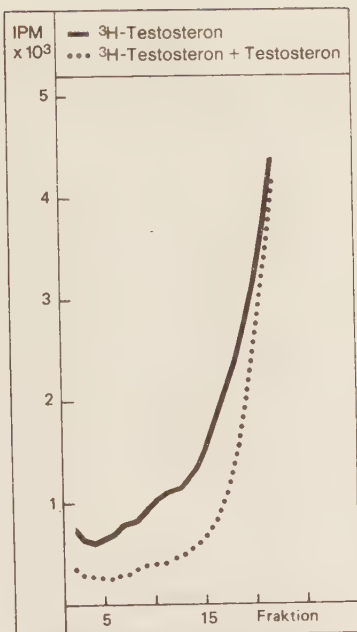


Abb. 4

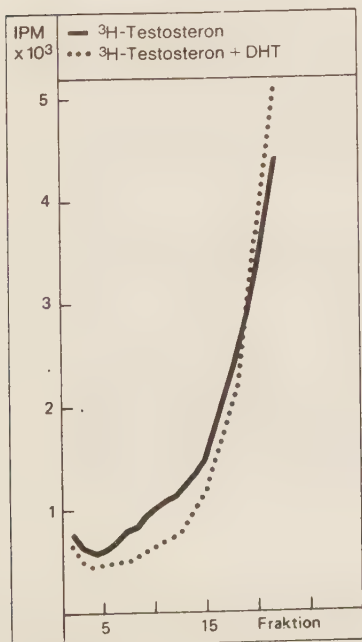


Abb. 5

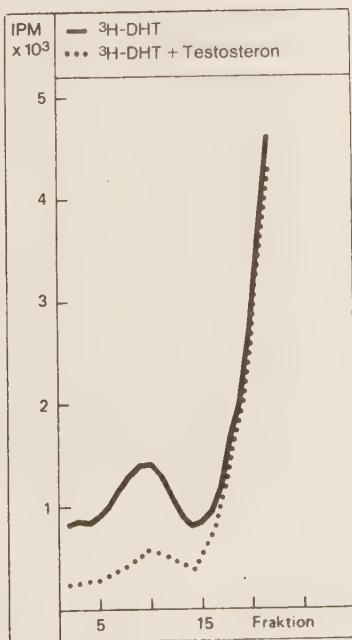


Abb. 6

Nach der Inkubation von ^3H -DHT mit Testosteron (im Verhältnis 1:1) entsteht ein Aktivitätsverlust von 58 % (Abb. 6).

Wie Abb. 6 zeigt, ist Testosteron in der Lage, ^3H -DHT aus seiner Bindung am cytoplasmatischen Rezeptor der Rattenprostata zu verdrängen (siehe auch HANSSON, 1971). Es wurde daher erwartet, daß bei der Inkubation von Cytosol mit ^3H -Testosteron eine Aktivitätsverteilung - ähnlich der bei ^3H -DHT Inkubation - mit einem Rezeptorpeak entsteht. Wie aus den Abbildungen 3-5 hervorgeht, ließ sich dieser aber nicht darstellen. Eine Kompetition im Bereich des erwarteten Peaks trat bei der Inkubation von ^3H -Testosteron mit Testosteron oder DHT aber ein. Eine Erklärung hierfür kann vielleicht an Hand der unterschiedlichen Assoziationskonstanten der Rezeptorprotein- bzw. Nichtrezeptorproteinbindung von Testosteron und DHT gegeben werden. Für die Testosteronbindung an den cytoplasmatischen Rezeptor der Rattenprostata waren in der Literatur keine Angaben zur Assoziationskonstanten aufzufinden. Die Assoziationskonstante für die Bindung von DHT an den cytoplasmatischen Androgenrezeptor der Rattenprostata soll nach Untersuchungen von FANG, ANDERSON und LIAO (1969) $3 \cdot 10^{10}$ betragen. Nach Angaben von STERN und EISENFELD (1969) sowie TVETER und HANSSON (1969) soll die Assoziationskonstante für die Bindung des Testosteron an den cytoplasmatischen Androgenrezeptor der Rattensamenblase $4 \cdot 10^9$ betragen. Wenn man annimmt, daß die Assoziationskonstanten für Testosteron in Samenblase und Prostata etwa gleich sind, dann liegt die Assoziationskonstante für Testosteron in der Prostata in der gleichen Größenordnung wie die Assoziationskonstante für DHT. Für die Richtigkeit dieser Annahmen sprechen die in Abb. 6 gezeigten Ergebnisse, nach

denen "kaltes" Testosteron die ^3H -DHT-Bindung an den cytoplasmatischen Rezeptor der Rattenprostata um etwa 50 % herabsetzt, wenn beide Steroide - Testosteron und ^3H -DHT - in gleicher Konzentration im Inkubationsansatz vorhanden sind.

Das Fehlen eines eindeutigen ^3H -Testosteron Peaks in den Abbildungen 3-5 kann daher nicht als Hinweis auf eine fehlende Bindung von Testosteron an den cytoplasmatischen DHT-Androgenrezeptor der Rattenprostata verstanden werden. Es liegt vielmehr nahe, das Fehlen eines ausgeprägten ^3H -Testosteron Peaks mit einer zusätzlichen unspezifischen Bindung von Testosteron an Makromoleküle des Rattenprostatacytosols zu erklären.

Zusammenfassend folgt aus den vorstehend beschriebenen Ergebnissen, daß für Untersuchungen der Bindung verschiedener Steroide an den cytoplasmatischen Androgenrezeptor der Rattenprostata ^3H -Testosteron nicht geeignet ist, da sich mit dieser Bindung kein eindeutiger Rezeptorpeak ausbildet. Im Gegensatz dazu bietet sich ^3H -DHT für Verdrängungsstudien an, da sich mit ^3H -DHT reproduzierbar bei der Cytosolfraktionierung der Rezeptorpeak darstellt, dessen Abnahme - wie oben erläutert - als Meßgröße für die Bindung der zu untersuchenden Steroide benutzt werden kann.

4.1.3.2 Prüfung der Bindungsfestigkeit von DHT an den cytoplasmatischen Androgenrezeptor der Rattenprostata

Wie in der Methodik auf Seite 19 beschrieben, wurden das ^3H -DHT und das auf seine Bindung an den Androgenrezeptor zu untersuchende Steroid gleichzeitig dem Cytosol zugesetzt. Wie die folgenden Untersuchungen zeigen, ist der gleichzeitige Zusatz

des ^3H -DHT und des nicht radioaktiv markierten Steroids erforderlich, da nach einmal erfolgter Bindung des ^3H -DHT an den Rezeptor eine Verdrängung des ^3H -DHT selbst durch einen hohen Überschuß von nicht radioaktiv markiertem DHT nicht mehr möglich ist.

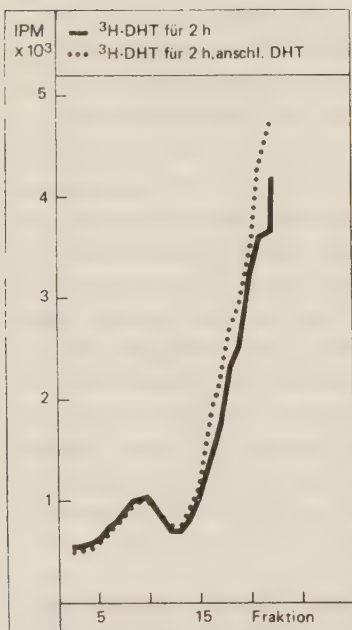


Abb. 7

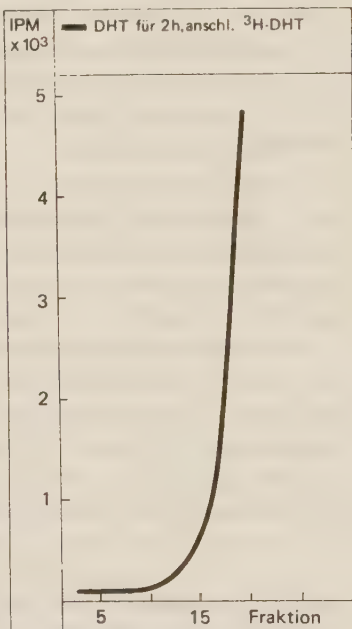


Abb. 8

Abb. 7 zeigt, daß die Größe des ^3H -DHT Peaks nicht beeinflusst wird, wenn nach zweistündiger Inkubation des Cytosols mit ^3H -DHT nach Zugabe einer hundert-

fachen Menge von "kaltem" DHT für weitere dreißig Minuten inkubiert wird.

Die aus diesem Ergebnis ableitbare Irreversibilität der ^3H -DHT-Bindung an den cytoplasmatischen Androgenrezeptor geht auch aus den in Abb. 8 gezeigten Ergebnissen hervor. In diesem Versuch wurde das Cytosol zunächst zwei Stunden mit nicht radioaktiv markiertem DHT inkubiert. Die im Anschluß daran für weitere dreißig Minuten fortgesetzte Inkubation des Cytosols mit ^3H -DHT führt nicht mehr zur Ausbildung des ^3H -DHT Rezeptorpeaks. Beide Versuchsansätze unterstreichen die Notwendigkeit, bei der Ermittlung der Bindung eines Steroids an den cytoplasmatischen Androgenrezeptor das ^3H -DHT und das zu untersuchende Steroid gleichzeitig zum Cytosol zuzusetzen.

4.1.3.3 Versuche zur Abschätzung des ^3H -DHT Sättigungskonzentrationsbereiches für den cytoplasmatischen Androgenrezeptor

Um die Verminderung des ^3H -DHT Peaks als Meßgröße für die Bindung eines Steroids an den cytoplasmatischen Androgenrezeptor zu benutzen, muß mit einer Sättigungskonzentration gearbeitet werden. Um angenähert einen Anhalt für die ^3H -DHT-Konzentration zu erhalten, bei der die im Cytosol vorhandenen DHT-Rezeptoren gesättigt sind, wurden einige orientierende Untersuchungen durchgeführt, in denen jeweils gleiche Mengen des gleichen Cytosols mit steigenden ^3H -DHT-Mengen inkubiert wurden. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Abb. 9 dargestellt. Qualitativ erkennt man aus dieser Abbildung, daß sich bis zu einer ^3H -DHT-Konzentration von $6,4 \cdot 10^{-10}$ Mol/l noch kein Peak ausbildet. Von einer Konzentration von $0,9 \cdot 10^{-9}$ Mol/l ^3H -DHT an tritt ein ausgeprägter

^3H -DHT Peak auf, der aber bei einer Konzentration von $2,7 \cdot 10^{-8}$ Mol/l ^3H -DHT nur noch als Schulter erkennbar ist.

Der Kurvenverlauf bei steigenden ^3H -DHT-Konzentrationen ist qualitativ verständlich, wenn man berücksichtigt, daß im Bereich der Fraktionen von etwa 3 bis 14 neben den spezifisch bindenden Rezeptorproteinen ein sehr großer Überschuß an unspezifisch bindenden Proteinen vorhanden ist. Es wird sich also jeweils das spezifisch und unspezifisch gebundene ^3H -DHT überlagern. Da die Kapazität der unspezifisch bindenden Proteine sehr viel größer ist als die Kapazität der spezifischen Rezeptoren, wird der am Rezeptor spezifisch gebundene DHT-Anteil mit steigender DHT-Menge relativ immer kleiner werden. Daß sich überhaupt trotz der sehr viel höheren Kapazität der unspezifischen Proteine im Cytosol ein DHT-Rezeptorpeak ausbildet, ist Ausdruck dafür, daß die Affinität des ^3H -DHT zum Rezeptor sehr viel größer ist als die Affinität zu den unspezifisch bindenden Proteinen.

Diese Aussagen werden besonders deutlich, wenn man - wie in Abb. 10 dargestellt - die ^3H -DHT- und Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen nach Dichtegradientenzentrifugation vergleicht.

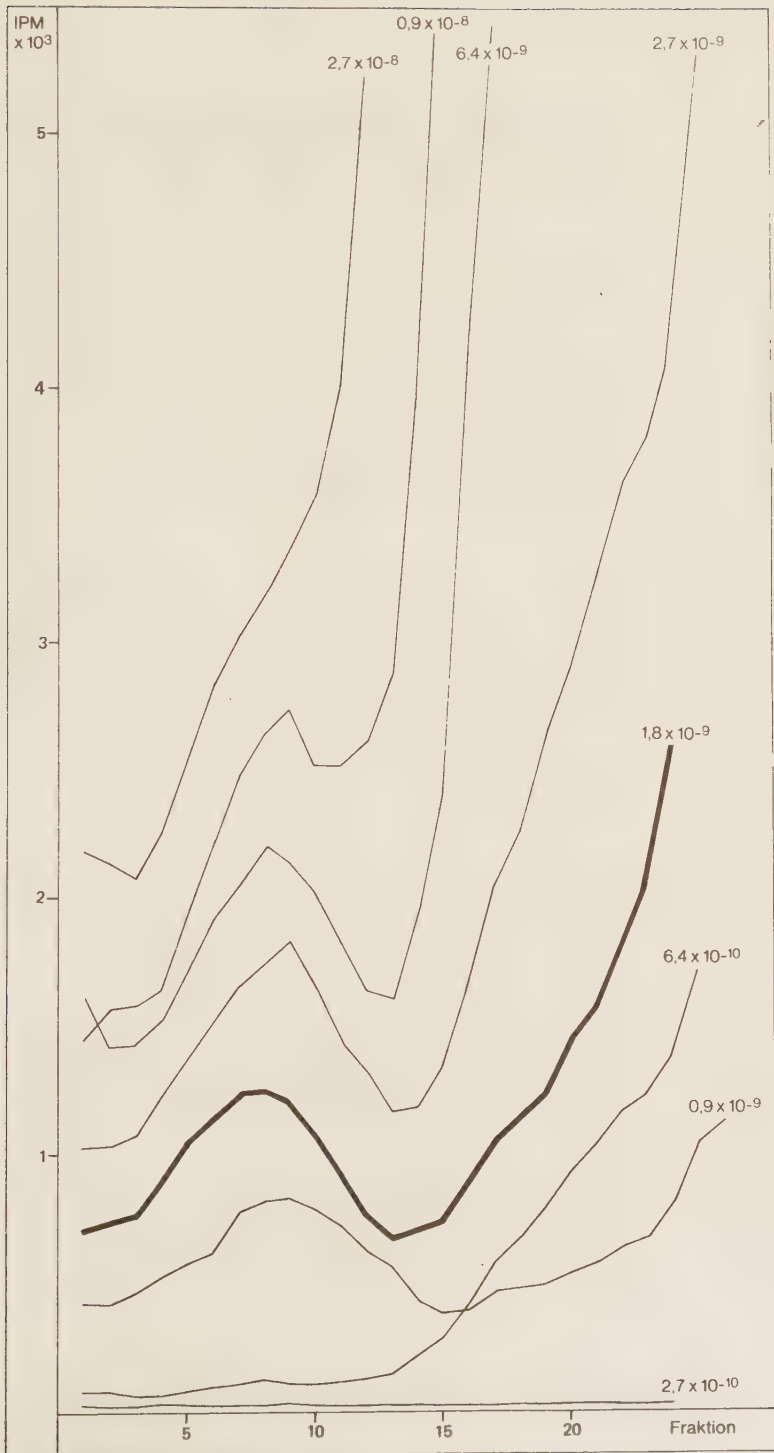


Abb. 9

Die Proteinbestimmung der einzelnen Fraktionen wurde nach der Methode von LOWRY durchgeführt (LOWRY, ROSEBROUGH, FARR und RANDALL, 1951).

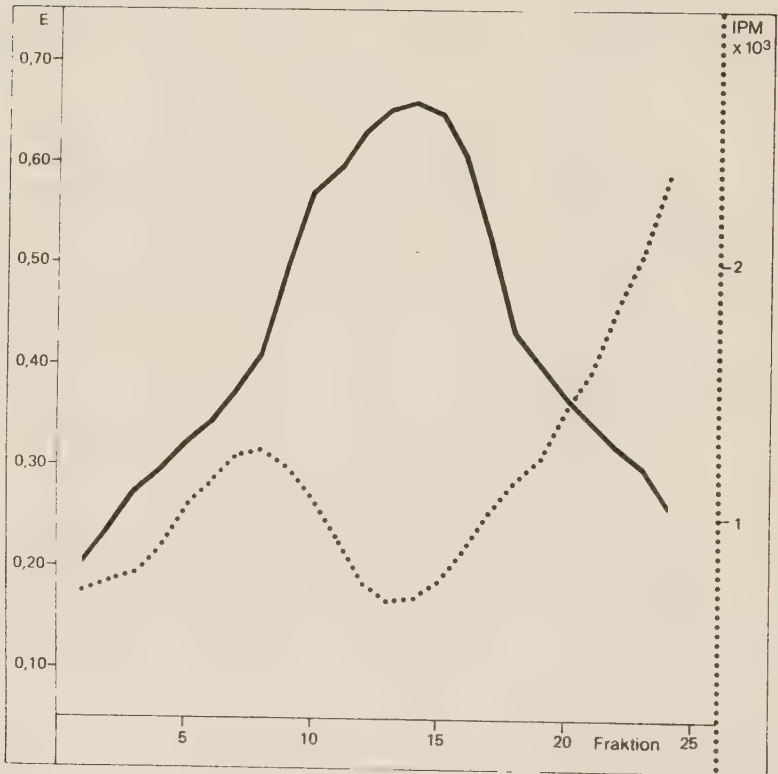


Abb. 10: — Proteinverteilung im Gradienten
..... ^3H -DHT

Das dem Rezeptorpeak entsprechende ^3H -DHT-Maximum liegt im Bereich der Fraktionen 7-8. Die ^3H -DHT-Konzentration fällt danach stark ab, obgleich die Protein-

konzentration bis etwa zur Fraktion 15 kontinuierlich stark zunimmt, so daß das Maximum des Proteingehaltes in etwa denselben Fraktionen liegt wie das ^3H -DHT-Minimum.

Auf Grund dieser Überlegungen und der in Abb. 9 dargestellten Versuchsergebnisse wurde zur Bestimmung der Rezeptorbindung verschiedener Steroide eine ^3H -DHT-Konzentration von $1,8 \cdot 10^{-9}$ Mol/l ausgewählt. Die Brauchbarkeit der für die Bindungsversuche aus Abb. 9 festgelegten ^3H -DHT-Konzentration wird durch den Befund unterstrichen, daß der Zusatz der gleichen Menge von nicht radioaktiv markiertem DHT zum Inkubationsansatz den ^3H -DHT Peak um ca. 50 % vermindert (siehe Abb. 1).

Zur Abschätzung der im Rezeptorpeak enthaltenen Rezeptormenge wurde zunächst - unter der Annahme, daß diese Impulszahl auf eine unspezifische Bindung des ^3H -DHT an Protein zurückgeführt werden kann - von den in den einzelnen Fraktionen gemessenen Impulsen jeweils $6 \cdot 10^{12}$ Impulse abgezogen. Die unter dieser Voraussetzung auf die ^3H -DHT Rezeptorproteinbindung entfallende Impulszahl errechnete sich für den Gesamtpeak zu etwa $5 \cdot 10^3$ IPM. Bei einer Zählausbeute von etwa 30 % entspricht dies 15.000 dpm. Bei einer spezifischen Aktivität des ^3H -DHT von ca. 50 Ci/mMol entspricht die gebundene ^3H -DHT Aktivität $0,14 \cdot 10^{-12}$ Mol DHT.

Wenn man unterstellt, daß ein Rezeptormolekül ein Molekül DHT binden kann und wenn man weiter unterstellt, daß bei der angewandten DHT-Konzentration alle Rezeptormoleküle mit DHT besetzt sind, dann sind im Gesamtpeak auch ca. $0,14 \cdot 10^{-12}$ Mol Rezeptorprotein vorhanden.

$$\begin{aligned} 5 \cdot 10^3 \text{ IPM} &= 15 \cdot 10^3 \text{ dpm} = 1,5 \cdot 10^4 \text{ dpm} \\ \text{gebundene Akt.} &= \text{Zählausbeute} \end{aligned}$$

$$2,2 \cdot 10^{12} \text{ dpm} = 1 \text{ Ci}$$

$$1,5 \cdot 10^4 \text{ dpm} = x \text{ Ci}$$

$$x = \frac{1,5 \cdot 10^4}{2,2 \cdot 10^{12}} = 0,68 \cdot 10^{-8} \text{ Ci}$$

im Peak gebunden

$$50 \text{ Ci} = 1 \text{ mMol}$$

$$0,68 \cdot 10^{-8} \text{ Ci} = x \text{ mMol}$$

$$x = \frac{0,68 \cdot 10^{-8}}{50} = \frac{0,68 \cdot 10^{-8}}{0,5 \cdot 10^2} =$$

$$1,4 \cdot 10^{-10} \text{ mMol}$$

$$= 1,4 \cdot 10^{-13} \text{ Mol}$$

$$= 0,14 \cdot 10^{-12} \text{ Mol}$$

Molgewicht Rezeptor:

$$3 \cdot 10^5 \text{ g} = 1 \text{ Mol}$$

$$x \text{ g} = 0,14 \cdot 10^{-12} \text{ Mol}$$

$$x = 0,14 \cdot 10^{-12} \cdot 3 \cdot 10^5 = 0,42 \cdot 10^{-7} \text{ g} = 0,042 \text{ ug}$$

$$= 0,42 \cdot 10^{-5} \text{ pg Rezeptor im Peak}$$

Gesamtproteinmenge 3 mg

0,042 ug auf Rezeptorprotein

$$\frac{3 \cdot 10^{-3} \text{ g}}{0,04 \cdot 10^{-6} \text{ g}} = 0,75 \cdot 10^2 \cdot 10^3 = \underline{\underline{75.000}}$$

(1/1000 %)

Bei einem Molekulargewicht des Rezeptorproteins von ca. $3 \cdot 10^5$ entsprechen 0,14 pMol etwa $0,4 \cdot 10^5$ pg Rezeptorprotein im Gesamtpeak.

Von der zur Gradientenzentrifugation eingesetzten Gesamtproteinmenge von ca. 3,0 mg entfallen demnach ca. 0,04 ug auf das Rezeptorprotein. Die Gesamtproteinmenge ist nach dieser angenäherten Rechnung ca. um den Faktor 75.000 größer als die Rezeptormenge.

4.1.3.4 Untersuchungen zur Bindung von Cyproteronacetat und strukturell verwandten Verbindungen an den cytoplasmatischen DHT-Rezeptor der Rattenprostata

Die untersuchten Steroide sind in der Abb. 11 zusammengestellt, die prozentuale Verminderung der ^3H -DHT-Bindung an den cytoplasmatischen Androgenrezeptor der Rattenprostata durch diese Steroide zeigt Abb. 12.

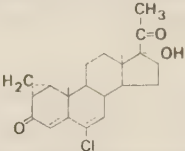
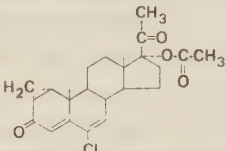
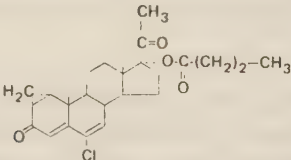
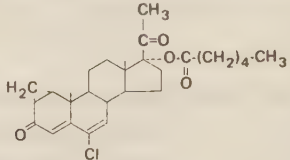
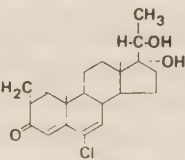
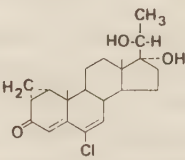
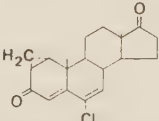
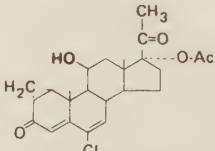
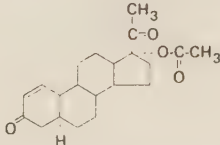
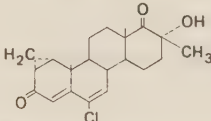
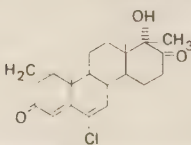
1) Cyproteron	15,0	2) Cyproteronacetat	49,5
			
3) Cyproteronbutyrat	32,5	4) Cyproteroncapronat	22,5
			
5) 20α-OH Cyproteron	10,0	6) 20β-OH Cyproteron	19,5
			
7) 17-Ketocyproteron	12,0	8) 11β-OH Cyproteronacetat	30,0
			
9) 17-Acetoxy-5α-Pregn-1-en-3,20-dion	12,5	10) 1,2α-Methylen-6-Chlor-17α-Hydroxy-17β-Methyl-D-homo-4,6-Androstadien-3,17a-dion	18,0
			
11) 1,2α-Methylen-6-Chlor-17α-Hydroxy-17β-Methyl-D-homo-4,6-Androstadien-3,17-dion	18,5		
			

Abb. 11

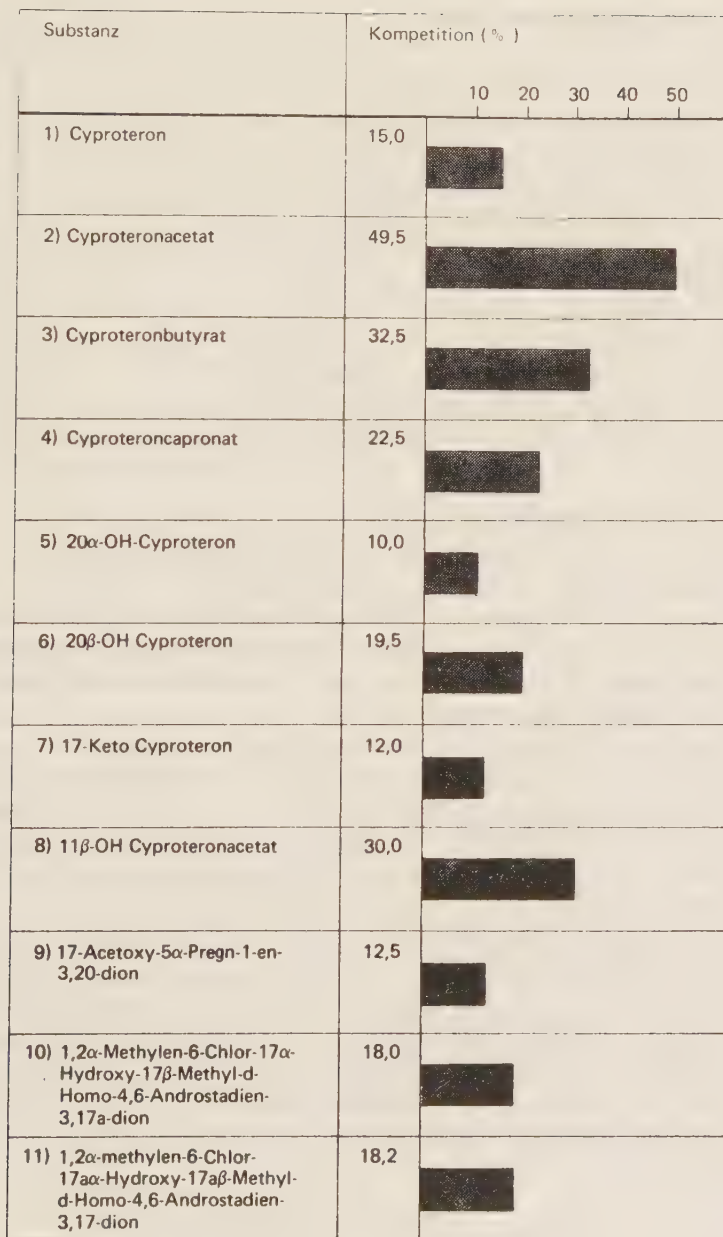


Abb. 12

5. DISKUSSION

Cyproteronacetat ist von den untersuchten Steroiden der stärkste Inhibitor der ^3H -DHT-Bindung; diese wurde unter den standardisierten Versuchsbedingungen durch Cyproteronacetat um ca. 50 % herabgesetzt. Das nicht veresterte Cyproteron zeigt demgegenüber nur eine schwache Bindung an den DHT-Rezeptor und reduziert die ^3H -DHT-Bindung nur um ca. 15 %. Dieser Befund zeigt, daß die von NEUMANN und Mitarbeitern tierexperimentell bereits beschriebene relativ schwache antiandrogene Eigenschaft des Cyproteron nicht nur auf seine fehlende antigonadotrope Wirkung, sondern zusätzlich auf seine gegenüber Cyproteronacetat nur geringe Bindungsaffinität zum Androgenrezeptor zurückzuführen ist.

In der Gestagenreihe ist bekannt, daß z.B. 17_{α} -Hydroxyprogesteron nur sehr schwach an den Gestagenrezeptor des Uterus gebunden wird und daß diese Bindung durch Veresterung der tertiären 17_{α} -Hydroxygruppe sehr verstärkt wird. Für die Bedeutung der 17_{α} -Estergruppierung für die Rezeptorbindung gibt es in der Gestagenreihe zahlreiche Beispiele, die alle zeigen, daß durch die Veresterung der 17_{α} -Hydroxygruppe mit Fettsäuren verschiedener Kettenlänge die Bindungsaffinität stark erhöht wird. Offensichtlich gilt dies nicht nur für den Progesteronrezeptor des Uterus, sondern auch für den DHT-Rezeptor der Prostata. Durch Verlängerung der Fettsäurekette wird die Bindung der 17_{α} -Ester an den DHT-Rezeptor offensichtlich herabgesetzt. Wie die Abb. 12 zeigt, vermindert Cyproteronacetat die DHT-Bindung um ca. 50 %, Cyproteronbutyrat um ca. 30 %, Cyproteroncapronat um ca. 20 %. Dies steht im Gegensatz zu unveröffentlichten Befunden von P. JUNGBLUT (Max Planck Institut, Wilhelms-haven), nach denen 17_{α} -Hydroxy- 19 -nor-progesteronacetat und das entsprechende Capronat praktisch etwa gleich stark an den Gestagenrezeptor des Uterus gebunden werden.

Die tierexperimentell beschriebene wesentlich stärkere antiandrogene Wirkung des Cyproteronacetats im Vergleich zu Cyproteron ist aber nicht nur durch die stärkere Bindung des Esters an den cytoplasmatischen DHT-Rezeptor bedingt, sondern auch durch ein unterschiedliches pharmakokinetisches Verhalten der beiden Verbindungen. Das nicht veresterte Cyproteron wird in vivo sehr rasch metabolisiert, wobei die enzymatische Reduktion der 20-Ketogruppe ganz im Vordergrund steht. Die Folge der raschen Metabolisierung des Cyproteron ist, daß nach oraler Verabreichung von radioaktiv markiertem Cyproteron nur ein Bruchteil der im Plasma nachweisbaren Radioaktivität auf unverändertes, der Hauptteil auf das nach 20-Hydroxy reduzierte Cyproteron entfällt (GERHARDS, RÖPKE, SCHULZE, 1970). Wie aus Abb. 12 zu entnehmen ist, wird das im Plasma des Menschen nach oraler Cyproteronverabreichung vorwiegend vorhandene 20-Hydroxycyproteron nur wenig an den DHT-Rezeptor gebunden, das heißt, dieser Hauptmetabolit zeigt eine noch geringere antiandrogene Wirkung als das Cyproteron selbst.

Durch Acetylierung der 17-Hydroxygruppe des Cyproteron wird der Hauptstoffwechselschritt, die Reduktion der 20-Ketogruppe gehemmt, so daß nach oraler Verabreichung des Cyproteronacetats im Plasma des Menschen praktisch nur unverändertes Cyproteronacetat nachweisbar ist (GERHARDS, GUTSCHE, RIEMANN, 1973). Nach oraler Verabreichung gleicher Dosen Cyproteronacetat bzw. Cyproteron stellt sich daher beim Menschen im Plasma eine deutlich höhere Wirkstoffkonzentration ein.

Die stärkere antiandrogene Wirkung des Cyproteronacetats im Vergleich zum Cyproteron resultiert somit erstens aus der stärkeren Bindung des Cyproteronacetats an den DHT-Rezeptor und zweitens aus dem nach Cyproteronacetatverabreichung auftretenden deutlich höheren Wirkstoffspiegel im Plasma.

Das 17-Ketocyproteron wurde im Harn des Menschen als Metabolit nach oraler Verabreichung von Cyproteron in konjugierter Form nachgewiesen (GERHARDS, RÖPKE, SCHULZE, 1970). Nach Abb. 12 zeigt dieser Metabolit, der durch Abspaltung der Seitenkette aus Cyproteron entsteht, nur eine sehr geringe Bindung an den DHT-Rezeptor und dürfte damit ebenso wie der Metabolit 20 α -Hydroxycyproteron nur eine sehr geringe antiandrogene Wirkung besitzen.

Es ist bemerkenswert, daß die Verbindung 17 β -Acetoxy-5 β -pregn-1-en-3,20-dion nur sehr wenig an den DHT-Rezeptor der Rattenprostata gebunden wird. In dieser Verbindung (Abb.11) ist die Molekülstruktur am Ring D die gleiche wie beim Cyproteronacetat. Die Anordnung der Ringe A und B entspricht aber in viel höherem Maße der Anordnung im DHT, so daß man eine stärkere Bindung dieser Verbindung an den DHT-Rezeptor hätte erwarten können.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten in vitro Untersuchungen zur "Intrinsic Activity" verschiedener Cyproteronanaloga bestätigen die umfangreichen tierexperimentellen Ergebnisse mit sehr vielen synthetisierten Verbindungen, wonach Cyproteronacetat aus der Reihe der untersuchten Verbindungen das stärkste Antiandrogen ist und bereits kleine Veränderungen am Molekül zu einer Abschwächung der antiandrogenen Eigenschaft führen. Dies gilt nicht nur - wie vorstehend gezeigt - für Veränderungen an den Ringen A und B, sondern auch für Veränderungen am Ring D. Es ist überraschend, daß eine Hydroxylierung des Cyproteronacetats in 11 β -Stellung die Bindung an den DHT-Rezeptor relativ geringfügig vermindert. Wie aus Abb. 12 zu erkennen ist, ist 11 β -Hydroxycyproteronacetat immerhin ein dem Cyproteronbutyrat vergleichbarer kompetitiver Inhibitor.

Wie bereits beim 17-Ketocyproteron (Nr.7 in Abb.12) gezeigt, führen stärkere Veränderungen im D-Ringsystem wie z.B. bei den D-Homoverbindungen Nr.10 und Nr.11 (Abb.11) zu einer starken Verminderung der Bindung an den DHT-Rezeptor.

Zusammenfassend folgt aus den beschriebenen in vitro Versuchen, daß entsprechend den in vivo erhobenen Befunden Cyproteronacetat von den untersuchten Verbindungen am stärksten vom DHT-Rezeptor gebunden wird. Die Untersuchungen bestätigen die von NEUMANN und Mitarbeitern aufgestellte Hypothese, daß die antiandrogene Wirkung des Cyproteronacetats auf einer kompetitiven Hemmung der Bindung von DHT bzw. Testosteron an den cytoplasmatischen Rezeptor des Zielorgans beruht.

Wenn in der vorliegenden Arbeit auch mit radioaktiv markiertem DHT als Tracer gearbeitet wurde, so bedeutet dies nicht, daß der cytoplasmatische sogenannte DHT-Rezeptor als physiologisches (intrazelluläres) Transportprotein für DHT angesprochen werden muß, da Testosteron von diesem cytoplasmatischen Rezeptor praktisch gleich stark gebunden wird wie DHT. Es ist bekannt, daß zumindest in der Rattenprostata Testosteron im Kern in 5α -DHT überführt wird und daß 5α -DHT die Zellteilung der Prostata stimuliert. Im Cytoplasma wird Testosteron im Gegensatz dazu in das $3\beta,17\beta$ - 5α -Androstadiol überführt, eine Verbindung, die das Wachstum und die Sekretion der Prostatazelle stimuliert (BAULIEU EE., LASNITZKY und ROBEL, 1968). Man könnte sich demnach vorstellen, daß Testosteron nach Eindringen in die Prostatazelle an den cytoplasmatischen sogenannten DHT-Rezeptor gebunden wird und so als Komplex zum Kern transportiert wird. Im Kern der Prostatazelle würde Testosteron in das 5α -DHT überführt, das dort die Mitose und damit die Zellteilung stimulieren würde. Nach Freisetzung aus dem Kernkompartiment könnte das 5α -DHT im Cytoplasma in das $3\beta,17\beta$ - 5α -Androstadiol überführt werden. Vor dem Hintergrund der hypothetischen Annahme, daß der sogenannte DHT-Rezeptor unter physiologischen Bedingungen das intrazelluläre Transportprotein des Testosteron darstellt, könnte man vielleicht verstehen, daß die bezüglich der Anordnung in den Ringen A und B größere strukturelle Verwandtschaft der Verbindung Nr.9 zum DHT nicht zu einer stärkeren Bindung dieses Moleküls an den Rezeptor führt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Methode ist geeignet, die Bindung eines Steroids an den cytoplasmatischen DHT-Rezeptor der Prostata zu bestimmen, wobei die in vitro Befunde zunächst keine Aussage darüber erlauben, ob die Bindung Ausdruck einer androgenen oder antiandrogenen Wirkung ist. Der Vorteil der in vitro Untersuchung der Steroidbindung an den betreffenden Rezeptor des Zielorgans ist aber darin zu sehen, daß die Untersuchungen eine Aussage zur "Intrinsic Activity" unter Ausschaltung des pharmakokinetischen Verhaltens der Verbindungen ermöglichen, wobei, wie vorstehend erwähnt, "Intrinsic Activity" im vorliegenden Falle als androgene oder antiandrogene Wirkung zu verstehen ist.

LITERATURVERZEICHNIS

- ANDERSON, K.M., LIAO, S., FANG, S.: Receptor proteins for androgens
J. Biol. Chem. Vol. 244: 6584-6595, 1969
- AIZAWA, Y., MUELLER, G.C.: The effect in vivo and in vitro of estrogens on lipid synthesis in the rat uterus
J. Biol. Chem. 236: 381-386, 1961
- BAULIEU, E.E., JUNG, J.: A prostatic cytosol receptor
Biochem. Biophys. Res. Comm. Vol. 38: 599-606, 1970
- BAULIEU, E.E., LASNITZKI, I., ROBEL, P.: Metabolism of testosterone and action of metabolites on prostate glands grown in organ culture
Nature (Lond.) 219: 1155, 1968
- BRUCHOVSKY, N., WILSON, J.D.: The conversion of testosterone to 5 -androstan-17 β -ol-3-one by rat prostate in vivo and in vitro
J. Biol. Chem. 243: 2012, 1968
- FANG, S., LIAO, S.: Antagonistic action of anti-androgens on the formation of a specific dihydrotestosterone-receptor protein complex in rat ventral prostate
Mol. Pharmacol. 5: 428-431, 1969
- FANG, S., LIAO, S.: Androgen receptors
J. Biol. Chem. Vol. 246: 16-24, 1971
- GERHARDS, E., GUTSCHE, H., RIEMANN, J.: Biodynamik von 1,2 -Methylen-6-chlor-pregna-4,6-dien-17 -acetoxy-3,20-dion Cyproteronacetat nach oraler Verabreichung beim Menschen
Sonderdruck aus: "Arzneimittel-Forschung"
"Drug Research" 23: Nr.11, 1950-1955, 1973

- GERHARDS, E., RÖPKE, H., SCHULZE, P.E.: Biodynamics of
1,2-Methylene-6-chloro-pregna-4,6-dien-
17-ol-3,20-dione (Cyproterone) in man
following oral and intravenous administra-
tion
Acta Endocrinologica 64: 228-252, 1970
- HAMMERSTEIN, J., CUPCEANCU, B.: Behandlung des Hirsutismus
mit Cyproteronacetat
Deutsch. Med. Wschr. 94: 829-34, 1969
- HANSSON, V.: Uptake and retention of testosterone and
5 -dihydrotestosterone by rat ventral
prostate in vitro
Acta Endocrinologica 68: 89-97, 1971
- HANSSON, V., TVETER, K.J., ATTRAMADAL, A.: Uptake and
binding of 5 -dihydrotestosterone in rat
ventral prostate in vivo
Acta Endocrinologica 67: 384-392, 1971
- HAYNES, R.C.Jr., SUTHERLAND, E.W., RALL, T.W.: The role of
cyclic adenylic acid in hormone action
Recent. Progr. Hormone Res. 16: 121-138,
1960
- HECHTER, O., LESTER, G.: Cell permeability and hormone
action
Recent. Progr. Hormone Res. 16: 139-186,
1960
- JENSEN, E.V., DE SOMBRE, E.R.: Estrogen-receptor inter-
action
Science Vol. 182: 126-134, 1973
- JUNG, J., BAULIEU, E.E.: Neo-nuclear androgen receptor in
rat ventral prostate
Biochimie 53: 807-817, 1971

- KARLSON, P.: Wie wirken Hormone auf die Zelle ein?
Sonderdruck aus: Die Umschau in Wissenschaft und Technik 19: 595-597, 1963
- KARLSON, P., SEKERIS, C.E.: Biochemical mechanism of hormone action
Acta Endocrinologica 53: 505-518, 1966
- KARLSON, P., SEKERIS, C.E.: Wirkungsmechanismus der Steroidhormone
Dtsch. med. Wschr. 98: 831-835, 1973
- IASCHET, U., IASCHET, L.: Antiandrogentherapie der pathologisch gesteigerten und abartigen Sexualität des Mannes
Klin. Wschr. 45: 324, 1967
- LEHNINGER, A.L.: Action of thyroxine on mitochondria and oxidative phosphorylation
Proc. Intern. Symposium Enzyme Chem. Tokyo and Kyoto 2: 297-301, 1957
- LEVINE, R., GOLDSTEIN, M.S.: The mechanism of action of insulin
Recent Progr. Hormone Res. 11: 343-380, 1955
- LIAO, S., TYMOCZKO, J.L., LIANG, T.-M., ANDERSON, K.M., FANG, S.: Androgen receptors: 17 β -Hydroxy-5 α -androstan-3-one and the translocation of a cytoplasmatic protein to cell nuclei in prostate
in: Advances in the biosciences 7: 155, 1970
- LIAO, S., TYMOCZKO, J.L.: Retention of an androgen-protein complex by nuclear chromatin aggregates: heat labile factors
Biochim. Biophys. Acta 252: 607-611, 1971

- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, M.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.:
Protein measurement with the Folin-phenol
reagent
J. Biol. Chem. 193: 265-276, 1951
- MAINWARING, W.I.P.: A soluble androgen receptor in the
cytoplasm of rat prostate
J. Endocr. 45: 531-541, 1969
- MARTIUS, C., HESS, B.: Die Wirkungsweise des Schilddrüsen-
hormons
in: Hormone und ihre Wirkungsweise
Sonderdruck aus 5. Colloquium der Gesell-
schaft für physiologische Chemie,
Mosbach/Baden 1954
- NEUMANN, F., BERSWORDT-WALLRABE, R. von, ELGER, W.,
STEINBECK, H.: Hormonhemmer - Untersuchungen
mit Testosteron-Antagonisten
Sonderdruck aus 18. Colloquium der Gesell-
schaft für physiologische Chemie
Mosbach/Baden: 217-248, 1967
- NEUMANN, F., ELGER, W., STEINBECK, H.: Antagonisten der
Sexualhormone
Sonderdruck aus: Intern. Zeitschrift f.klin.
Pharmakologie, Therapie und Toxikologie
6/86: 475-488, 1968
- NEUMANN, F., BERSWORDT-WALLRABE, R. von, ELGER, W.,
STEINBECK, H.: Experimentelle Grundlagen
und klinische Anwendungsmöglichkeiten von
Antiandrogenen
Experimentelle Forschung Pharma, Schering AG
1970

- NEUMANN, F., ELGER, W., STEINBECK, H.: Antiandrogens and reproductive development
Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. 259: 179-184, 1970
- NEUMANN, F.: Antiandrogene
Sonderdruck aus Med. Klinik 11: 329-333, 1973
- RASMUSSEN, H., SCHWARTZ, I.L., SCHOESSLER, M.A., HOCHSTER, G.:
Studies on the mechanism of action of Vasopressin
Proceedings of the National Academy of Sciences USA 46: 1278-1287, 1960
- SCHEUER, A., DAHNKE, H.-G., JÄGER, E., MOSEBACH, K.-O.:
Einfluß von Cyproteronacetat auf den DNA- und RNA-Gehalt, den Einbau von [^{14}C] Uridin in die RNA sowie die Aufnahme von [^{14}C]-Testosteron in einigen Organen unreifer männlicher Ratten
Hoppe-Seyler's z. Physiol. Chem. 350: 1570-1576, 1969
- STERN, J., EISENFELD, A.: Androgen accumulation as binding to macromolecules in seminal vesicles: inhibition by cyproterone
Science N.Y. 166: 233-235, 1969
- TALAL, N., TOMKINS, G.M., MUSHINSKI, J.F. et al.:
Immunochemical evidence for multiple molecular forms of crystalline glutamic dehydrogenase
J. Molec. Biol. 8: 46-53, 1964
- TALALAY, P., WILLIAMS-ASHMAN, H.G.: Mechanims of hormone action. Paticipation of steroid hormones in the enzymic transfer of hydrogen
Recent Progr. Hormone Res. 16: 1-47, 1960

LEBENS LAUF

12.3.49 geb. in Berlin
Vater: Erwin Brauer
Mutter: Charlotte Brauer, geb. Jonsson

1955-59 Bonhoeffer-Grundschule, Berlin

1959-61 Steubenschule, Berlin

1961-68 Erich-Hoepner-Schule (Altsprachlicher Zug),
Berlin

1968 Abitur

1968-74 Studium der Humanmedizin an der Freien
Universität Berlin

1974 Ärztliche Prüfung, Berlin

1974-75 Medizinalassistentin

1975 Approbation als Ärztin

seit 5.1975 Assistenzärztin, Städt. Krankenhaus Britz,
Innere Abteilung,

